

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Anna Čaleta

Primjena biljaka u proizvodnji rekombinantnih proteina i antitijela

Završni rad

Split, 2018.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića, predan je na ocjenu
Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja
zvanja prvostupnica nutricionizma.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Studij: Nutricionizam
Odjel za biologiju
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

PRIMJENA BILJAKA U PROIZVODNJI REKOMBINANTNIH PROTEINA I ANTITIJELA

Anna Čaleta

SAŽETAK

Biljke se od davnina koriste za liječenje raznih bolesti. Osim klasičnih načina sinteze lijekova pomoću bakterija, kvasaca i uzgoja u kulturi životinjskih stanica, u današnje vrijeme se razmatra i mogućnost uzgoja genetski modificiranih biljaka koje sadrže rekombinantne proteine i antitijela za borbu protiv različitih patogena. Ti vrijedni sastojci se zatim mogu ekstrahirati i primijeniti u imunizaciji ili se može pojesti sami plod biljke te tada govorimo o "jestivom cjepivu". Najpoznatiji primjer lijeka proizvedenog u biljci je ZMapp, a koristio se 2014. godine protiv virusa ebole. "Jestiva cjepiva" još nisu primijenjena na ljudima, razvijaju se postepeno, dok su samo neka testirana na životinjama. Tehnologija proizvodnje farmaceutskih transgeničnih biljaka susreće se s brojnim prednostima i nedostacima te razrađuje posebne protokole za pojedinu biljnu vrstu. Koncept hrane, kao sredstva za imunizaciju, potencijalno bi mogao riješiti problem epidemija i zaraznih bolesti u siromašnim zemljama, čiji stanovnici nemaju pristup adekvatnoj medicinskoj skrbi.

Ključne riječi: Jestiva cjepiva, biljni lijekovi, imunizacija, transgenične biljke, rekombinantni proteini

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

Rad sadrži: 24 stranice, 7 slika, 3 tablice i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: Dr. sc. Ivica Šamanić, *docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Ocjenjivači: Dr. sc. Ivica Šamanić, *docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*
Dr. sc. Željana Fredotović, *docentica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*
Dr. sc. Ana Maravić, *docentica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Split
Faculty of Science
Study: Nutrition
Department of biology
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Bachelor's thesis

PLANT MOLECULAR PHARMING (PMP)

Anna Čaleta

ABSTRACT

Since earliest times, plants have been used to treat diseases. In addition to traditional methods of drug discovery using bacteria, yeast and cultured animal cells, plants which have been genetically engineered to contain recombinant proteins and antigens for vaccine development are being considered. These ingredients are taken out and can be used for immunization or also antigens produced in edible parts of the plants can be administered orally. Experimental drug ZMapp is produced in genetically modified tobacco plants which was first used on humans during the 2014 as a treatment for Ebola virus disease. "Edible vaccines" must be tested thoroughly on animals and then on humans to validate their efficacy. Plant pharming is faced with the numerous benefits and disadvantages in the production of edible vaccines of transgenic plants and elaborates special protocols for a particular plant species. The idea of plant derived edible vaccines have a possibility of preventing the spread of the infectious disease in poor countries with very poor health system.

Keywords: Edible vaccine, plant-made pharmaceuticals, immunization, transgenic plants, recombinant proteins

The thesis is deposited in the library of the Faculty of Science, University of Split.

Thesis includes: 24 pages, 7 figures, 3 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Mentor: **Ivica Šamanić, Ph.D.** Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Reviewers: **Ivica Šamanić, Ph.D.** Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split
Željana Fredotović, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split
Ana Maravić, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

The thesis was accepted: September 2018.

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom

PRIMJENA BILJAKA U PROIZVODNJI REKOMBINANTNIH PROTEINA I ANTITIJELA

izvodila samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića. U radu sam primijenila metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju diplomskog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u diplomskom radu na uobičajen, standardan način citirala sam i povezala s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica

Anna Čaleta

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Proizvodnja rekombinantnih proteina u biljkama	1
1.2. Prednosti i nedostaci uzgoja farmaceutskih transgeničnih biljaka	2
2. RAZRADA TEME.....	4
2. 1. Farmaceutske biljke za uzgoj rekombinantnih proteina	4
2. 2. Proces primjene biljaka u proizvodnji rekombinantnih proteina i antitijela.....	8
2. 2. 1. Stvaranje transgeničnih biljaka.....	8
2. 3. Primjena transgeničnih biljaka u farmaceutske svrhe	13
2. 3. 1. „Jestiva cjepiva“	13
2. 3. 2. Konvencionalna cjepiva	15
2. 3. 3. Lokalna primjena.....	15
2. 4. Primjeri transgeničnih biljaka koje se koriste u terapijske svrhe.....	16
2.4.1. Primjena na ljudima.....	16
2. 4. 2. Životinjske zaraze.....	18
2.5. Obćavajući kandidati za jestiva cjepiva.....	19
2. 5. 1. Ljubičaste rajčice protiv dijareje uzrokovane rotavirusom	19
2. 5. 2. Riža protiv alergije na grinje	19
2. 5. 3. Rajčice protiv malarije	19
3. ZAKLJUČAK	20
4. LITERATURA.....	21

1. UVOD

Biljke se koriste u medicinske svrhe još od ranih početaka civilizacije. Unatoč brojnim prednostima sintetski dobivenih organskih spojeva, procjenjuje se kako je otprilike jedna četvrtina današnjih lijekova i dalje biljnog porijekla. Razvitkom rekombinantne DNA tehnologije biljke su dobile još jednu dimenziju u farmaceutskoj primjeni. Primjene takvih biljaka su brojne, koriste se kako bi se iz njih ekstrahirao vrijedni biljni sastojak. Isto tako, u njima se mogu proizvoditi proteini od farmakološke važnosti, uključujući cjepiva za ljude i životinje, antitijela, hormone rasta, citokine, rekombinantne enzime i krvne proizvode za razne terapijske primjene. Za razliku od proteina proizvedenih u kulturi stanica sisavaca, oni proizvedeni u biljkama nemaju rizik za kontaminacijom mikroorganizmima, prionima koji su patogeni za ljude i životinje.¹ Primjena biljaka u proizvodnji rekombinantnih proteina i antitijela (engl. *plant molecular pharming*, PMP) koristi se za proizvodnju ljudskih proteina od terapijske važnosti i broj takvih istraživanja zadnjih godina u svijetu značajno raste.¹

1.1. Proizvodnja rekombinantnih proteina u biljkama

Posljednja dva desetljeća uzgoj transgeničnih farmaceutskih biljaka značajno raste – proizvedeni su brojni proteini od kojih su neki bili na pretkliničkom i kliničkom testiranju i na korak su do široke potrošnje. Antitijela protiv virusa ebole su proizvedena u biljci duhana, zatim testirana na primatima *Maccaca mulatta* oboljelim od ebole, gdje je postotak njihovog izlječenja bio 100 % te su u praksi korištena 2014. godine u Africi.²

Koncept jestivog cjepiva prvi put je predstavio Charles Arntzen sa suradnicima (1992.) nakon što je u biljci duhana proizveden antigen virusa hepatitisa B (HBsAG).¹ Miševi koji su hranjeni HBsAG-transgeničnim krumpirima pokazali su snažni imunosni odgovor protiv hepatitisa B. Kasnije su se ti isti nekuhani krumpiri testirali oralno na ljudima. Više od 60 % volontera je pokazalo jaku sistemsku i mukoznu imunost nakon što su konzumirali tri doze krumpira.² Iako ljude odvraća jedenje sirovog krumpira, a često i nosi razne nuspojave, ovi rezultati idu u smjeru napretka jer pokazuju kako bi se jestiva cjepiva mogla koristiti za projekte svjetske imunizacije i to za relativno nisku cijenu.

Posljedično, sve se više gena za imunizaciju pokušava eksprimirati u raznim usjevima, uključujući zelenu salatu, bananu, rajčicu, jagode i mnoge druge.

1.2. Prednosti i nedostaci uzgoja farmaceutskih transgeničnih biljaka

Biljke imaju potencijal za masovnu proizvodnju farmaceutskih proizvoda sa mnogo manje troškova nego tradicionalnim načinom. Biljke se mogu uzgojiti u staklenicima ili, ako je potrebno, u biološki sigurnom laboratoriju. Izvor za proizvodnju rekombiniranog proteina (lišće i sjemenke biljaka) je potencijalno neograničen. Trošak održavanja farmaceutskih transgeničnih biljaka je nizak u usporedbi s *E.coli*, kvascem ili staničnim kulturama sisavca (Tablica 1.). Točnije, cijena proizvodnje rekombinantnih proteina i antitijela je samo fragment troška u odnosu na cijenu koristeći stanice sisavaca, a između 10 i 50 puta jeftinije u odnosu na *E.coli*.³

Tablica 1. Usporedba različitih ekspresijskih platformi za proizvodnju lijekova (modificirano iz Spök and Karner 2008, European Communities)

	Transgenična biljka	Kultura biljne stanice	Bakterija	Kvasac	Kultura stanice sisavca	Transgenična životinja
Sveukupni trošak	Vrlo nizak	Srednji	Nizak	Srednji	Visok	Visok
Kapacitet	Vrlo visok	Srednji	Visok	Visok	Vrlo nizak	Nizak
Razmjer proizvodnje	Širom svijeta	Ograničen	Ograničen	Ograničen	Ograničen	Ograničen
Prinos proteina	Visok	Visok	Srednji	Visok	Srednje visok	Visok
Ispravnost smatanja	Visoka	Visoka	Niska	Srednja	Visoka	Visoka
Glikolizacija	Manje razlike	Manje razlike	Nema	Netočna	Točna	Točna
Kvaliteta produkta	Visoka	Visoka	Niska	Srednja	Visoka	Visoka
Rizik kontaminacije	Nizak	Nizak	Endotoksini	Nizak	Virusi, prioni, onkogeni DNA	Virusi, prioni, onkogeni DNA
Sigurnost	Visoka	Nije specificirano	Niska	Nepoznata	Srednja	Visoka
Trošak skladištenja	Jeftin	Srednje	Srednje	Srednje	Skup	Skup

Biljke kao sustav pomoću kojeg se ekspimiraju geni za željene rekombinantne proteine, ima nekoliko velikih prednosti u odnosu na kulture prokariotskih i raznih eukariotskih stanica, a to su brzina, trošak proizvodnje i sigurnost. Biljke mogu ispravno smotati kompleksne proteine

kao što su razna antitijela, imunoglobulini i vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF).²

Među prvim rekombinantnim proteinima dobivenim u transgeničnoj biljci su dobiveni iz biljke duhana i ekstrahirani su direktno iz ubranih listova.¹ Velika biomasa i brzi rast čine duhan pogodnim za komercijalnu primjenu u proizvodnji stranih antitijela i proteina. To također nije ni hrana ni za ljude ni za životinje pa je smanjen rizik za kontaminaciju stočne hrane ili hrane za ljude. Međutim, duhan sadrži značajan udio nikotina i drugih toksičnih alkaloida koji se moraju odstraniti prije nego se iz njega ekstrahiraju rekombinantni proteini. Ubrzo su znanstvenici počeli primjenjivati i druge biljke (na primjer zelena salata, krumpir, rajčica, riža) za sintezu željenih antitijela i proteina te su došli do saznanja kako se različite skupine biljaka mogu koristiti za različite svrhe i time povećati njihovu iskoristivost.

Valjalo bi napomenuti i kako se lijekovi već godinama proizvode pomoću drugih sustava (mikrobioloških i kultura životinjskih stanica) pa su te metode već pomno razrađene i usavršene. Industrija je razvila standarde i protokole za pročišćavanje lijekova, dok su biljni sustavi koje koristi PMP relativno novi, a protokoli za pročišćavanje nisu univerzalni. Primjerice, biljke kao što su duhan, kukuruz i riža svaka imaju različiti specifični sadržaj i sastav proteina i metabolita. Sustavi koji koriste PMP za dobivanje antitijela i proteina trebaju posebni protokol za svaku biljnu vrstu koja se koristi.

Korištenjem biljaka za proizvodnju antitijela i proteina otvorilo se mnogo prostora u znanosti za istraživanje i napredak. To je svakako kompleksni sustav, a ako se dovoljno razvije i raširi diljem svijeta može poslužiti kao snažno oružje za imunizaciju čitavog stanovništva.

2. RAZRADA TEME

2. 1. Farmaceutske biljke za uzgoj rekombinantnih proteina

Za proizvodnju prvih rekombinantnih proteina u biljci korišten je transgenični duhan zbog svoje velike biomase i brzog rasta.¹ Međutim, ubrzo je zamijenjen drugim lisnatim povrćem – zelenom salatom i klicama lucerne (*Medicago sativa*, L., engl. *Alfalfa sprouts*) zbog visokog udjela nikotina i ostalih toksičnih alkaloida. Iako je prednost korištenja zelenog lisnatog povrća velika biomasa, proteini eksprimirani u listovima biljaka su skloni brzoj proteolitičkoj razgradnji, što znači da jednom ubrani imaju ograničen vijek trajanja te da moraju biti procesuirani odmah nakon berbe. Također, pretjerana eksprimiranost stranih proteina u stanicama listova može dovesti do nekroze ili smrti stanice.

S druge strane, ti isti proteini eksprimirani u sjemenkama žitarica mogu stajati dugo vremena u skladištu, čak i pri sobnim temperaturama. Nekroze stanica u sjemenkama nema, a pročišćeni proteini pokazuju mogućnost otapanja nakupine fibrina ili krvnih ugrušaka, što se može iskoristiti u cilju liječenja određenih srčanih bolesti.² Zbog svega toga se sve više uzimaju u obzir sjemenke genetski modificiranih biljaka umjesto lisnatog povrća. Detaljnija usporedbu biljaka koje se mogu koristiti u proizvodnji rekombinantnih proteina prikazana je u Tablici 2. Također su i transgenične uljarice dobar izbor za proizvodnju rekombinantnih proteina jer je u njima olakšana izolacija proteina.

Tablica 2. Usporedba različitih biljaka koje se mogu koristiti u proizvodnji rekombinantnih proteina (modificirano iz Hair-Bejo, M. (2015). Farming of Plant-Based Veterinary Vaccines and Their Applications for Disease Prevention in Animals)

Biljka domaćin	Prednosti	Nedostaci
Biljke modeli		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Često korištena u preliminarnim studijama. Mali genom i kratak životni ciklus. Samooprašujuća, proizvodi brojne sjemenke. Izuzetno se dobro transformira pomoću metode koja koristi <i>Agrobacterium</i> .	Mala biomasa.
Duhan	Utvrđeni protokoli za transformaciju i ekspresiju. Velika biomasa. Nije hrana za ljude ili stoku. Postoje varijeteti s manjim udjelom alkaloida koji zahtijevaju manje procesiranja.	Rizik od križne kontaminacije s netransgeničnim duhanom. Visok sadržaj nikotina i ostalih toksičnih alkaloida. Nije moguća direktna konzumacija.
Lisnate biljke		
Lucerna	Utvrđeni protokoli za transformaciju. Direktna konzumacija korisna u imunizaciji životinja. Visok udio proteina. Velika biomasa. Mnogo berbi tijekom godine.	Rizik od križne kontaminacije s netransgeničnim biljkama. Niska stabilnost proteina. Kvarljiva, mora se procesuirati odmah nakon berbe.
Zelena salata	Jestiva je sirova, korisna u „jestivim cjepivima“. Brzo raste.	
Voće i povrće		
Krumpir	Utvrđeni protokoli za transformaciju. Može se dugotrajno skladištiti bez hlađenja.	Nizak udio proteina. Sirovi krumpir nije jestiv, a kuhanje može izazvati denaturaciju rekombiniranog

	Nizak rizik od križne kontaminacije u polju. Industrijsko procesuiranje gomolja je dobro ustanovljeno.	proteina.
Rajčica	Jestiva sirova. Velika biomasa. Prirodno visok udio vitamina A može pospješiti imunološki odgovor. Industrijski uzgoj i procesuiranje su dobro uspostavljeni.	Nizak udio proteina. Zbog kisele prirode može biti nekompatibilna s nekim antigenima. Brzo se kvari.
<hr/>		
Žitarice i mahunarke		
Kukuruz	Velika zrna i velika biomasa. Ustanovljena <i>invitro</i> manipulacija i transformacija. Industrijski uzgoj i procesuiranje su dobro proučeni.	Rizik od križne kontaminacije s kukuruzom namijenjenim ljudskoj upotrebi.
Riža	Velika biomasa. Industrijski uzgoj i procesuiranje su dobro proučeni. Samooprašujuća biljka.	Dobivanje krajnjeg produkta dugo traje.
Ječam	Samooprašujuća biljka.	Neučinkovit sustav transformacije.
Grašak Soja	Viši udio proteina nego u žitaricama. Samooprašujuće biljke.	Neučinkovita procedura transformacije. Niži godišnji prinos i skuplja proizvodnja u odnosu na kukuruz i rižu.

Nedavno su dizajnirane i nove biljne vrste, koje se jednostavno mogu čuvati, razmnožavati i transformirati, u cilju da se iz njih proizvedu rekombinantni proteini. Jedna od takvih biljaka je zelena alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Tablica 3.).

Tablica 3. Najčešće biljke koje se koriste u biofarmakološkoj industriji (modificirano iz Jelaska, S.; Mihaljević, S.; Bauer, N. Production of biopharmaceuticals, antibodies and edible vaccines in transgenic plants, 2005)

Biljka model	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Lisnato povrće	Duhan, salata, klice lucerne, djetelina
Žitarice	Kukuruz, riža, pšenica, ječam
Mahunarke	Soja, grašak, <i>Cajanus cajan</i>
Voće i povrće	Krumpir, mrkva, rajčica, banana
Uljarice	Uljana repica, <i>Camelina sativa</i>
Jednostavne biljke	<i>Lemna</i> sp., <i>Physcomitrella patens</i> , <i>Marchantia polymorpha</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

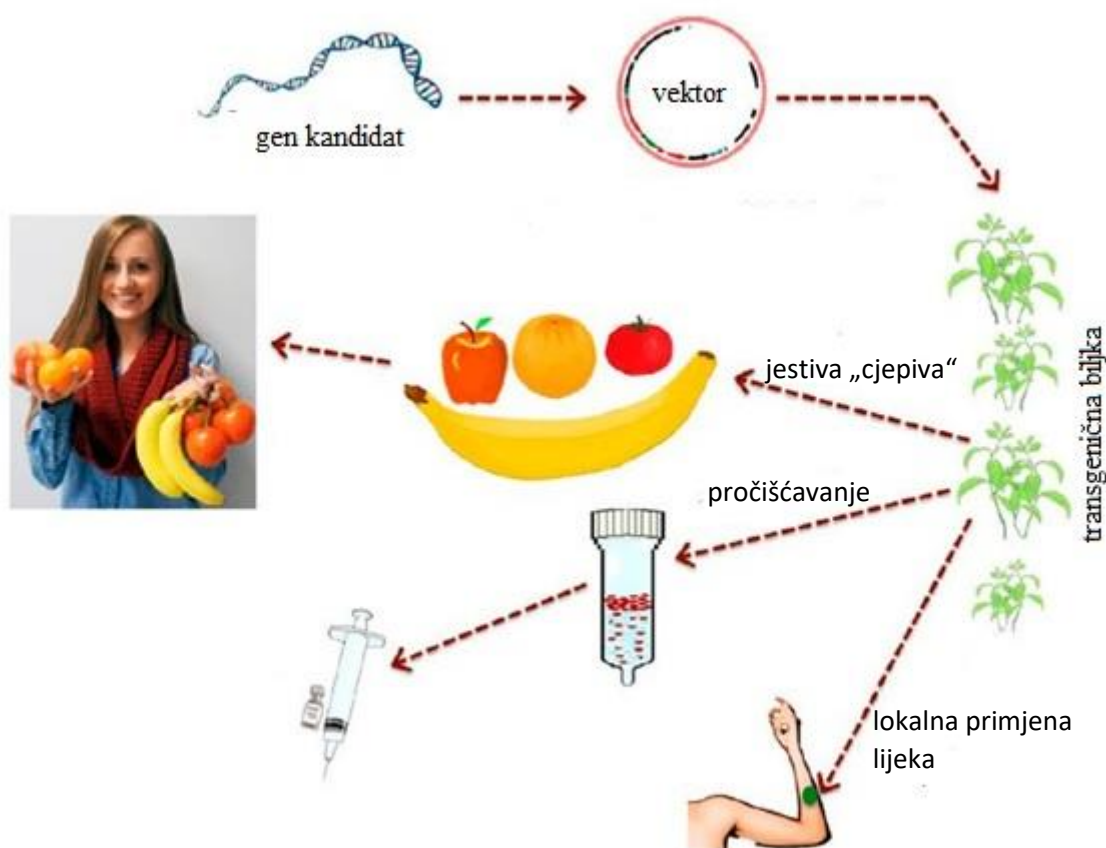
Voće, povrće i lisnate biljke mogu se konzumirati sirove ili djelomično toplinski obrađene što posebno pogoduje da budu korišteni za sastojak u cjepivu, aditiv u hrani i antitijelima koji se koriste za lokalnu imunizaciju.

Krumpiri su bili široko korišteni u proizvodnji cjepiva iz transgeničnih biljaka (antigen kolere⁴), a rajčice su korištene za prvi lijek protiv bjesnoće proizveden pomoću biljke.⁵ Salata je korištena u nizu kliničkih ispitivanja za razvoj rekombinantnog cjepiva protiv hepatitisa B.⁶

Banane su također razmotrene za proizvodnju cjepiva budući dozrijevaju u dijelovima svijeta gdje su cjepiva najpotrebitija. Prednost je i to što su to jestive biljke, a mogu je jesti i djeca u obliku kašice. Jedan od nedostataka je što banana, kao i primjerice rajčica, ima nizak udio proteina što ograničava količini antigena koji mogu biti eksprimirani.

2. 2. Proces primjene biljaka u proizvodnji rekombinantnih proteina i antitijela

Transgenična biljka za farmaceutske svrhe može se koristiti na tri glavna načina: u obliku takozvanih jestivih cjepiva, cjepiva i lokalnom primjenom lijeka (Slika 1.). Sukladno načinu primjene i izbora antitijela, odnosno proteina koji se trebaju proizvesti u takvoj biljci, kako bi od nje bilo medicinske pomoći, bira se gen kandidat i metoda uzgoja transgenične biljke.



Slika 1. Ilustracija procesa primjene biljaka u proizvodnji stranih proteina i antitijela (modificirano iz Yao, J.; Weng, Y.; Dickey, A.; Wang, K. Y. (2015). Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges)

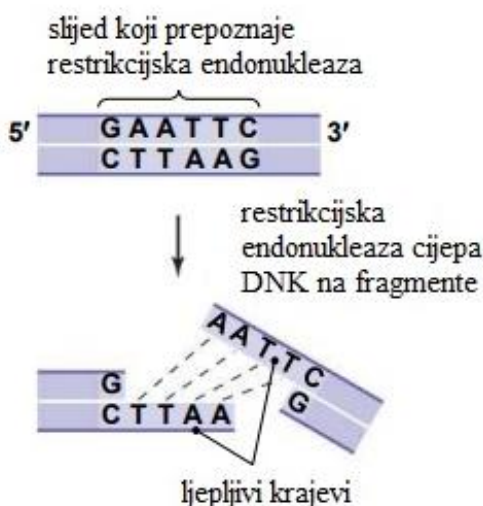
2. 2. 1. Stvaranje transgeničnih biljaka

Proizvodnja transgeničnih biljaka u cilju korištenja u liječenju određenih bolesti počinje odabirom gena kandidata koji kodira proteine što pomažu imunizaciju organizma, te

njegovom ugradnjom u genom biljne stanice. To se najčešće čini na dva načina: transformacijom biljnih stanica (Slika 4.) ili takozvanom „genskom puškom“ (Slika 5.).

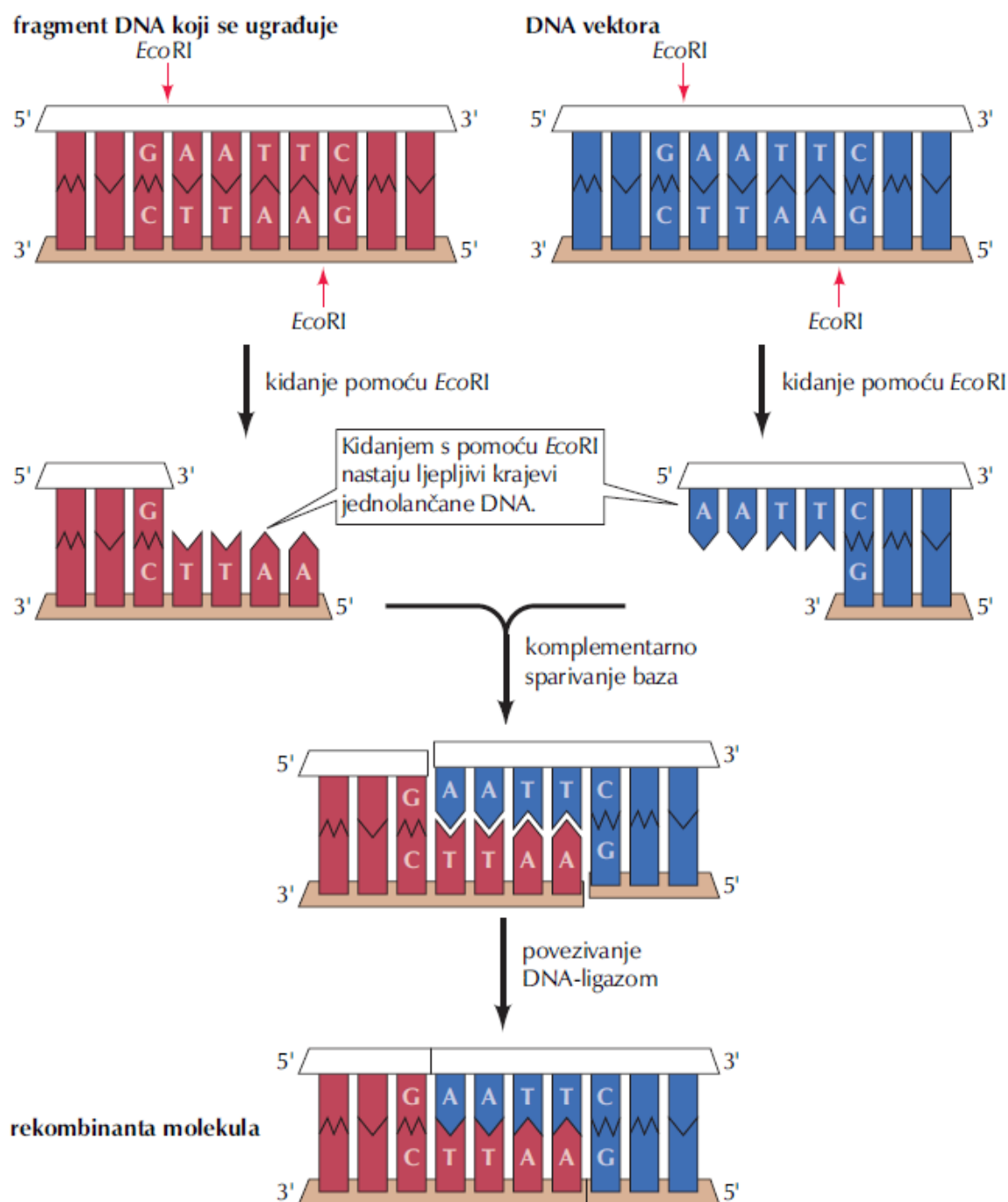
2. 2. 1. 1. Transformacija biljaka posredstvom *Agrobacterium* sp.

Gen kandidat je fragment molekule DNA dobiven djelovanjem određenih restrikcijskih endonukleaza („molekularnih nožica“) koje kidaju DNA na specifičnim redoslijedima (prepoznaju palindromske sekvence). Takvim cijepanjem DNA nastaju „ljepljivi krajevi“ koji se ponovno mogu povezati vodikovim vezama jer sadrže komplementarne baze (Slika 2.).



Slika 2. Skica cijepanja molekule DNA pomoću restrikcijske endonukleaze (modificirano iz Miller-Kittrell M. (2014). Chapter 8: Recombinant DNA Technology)

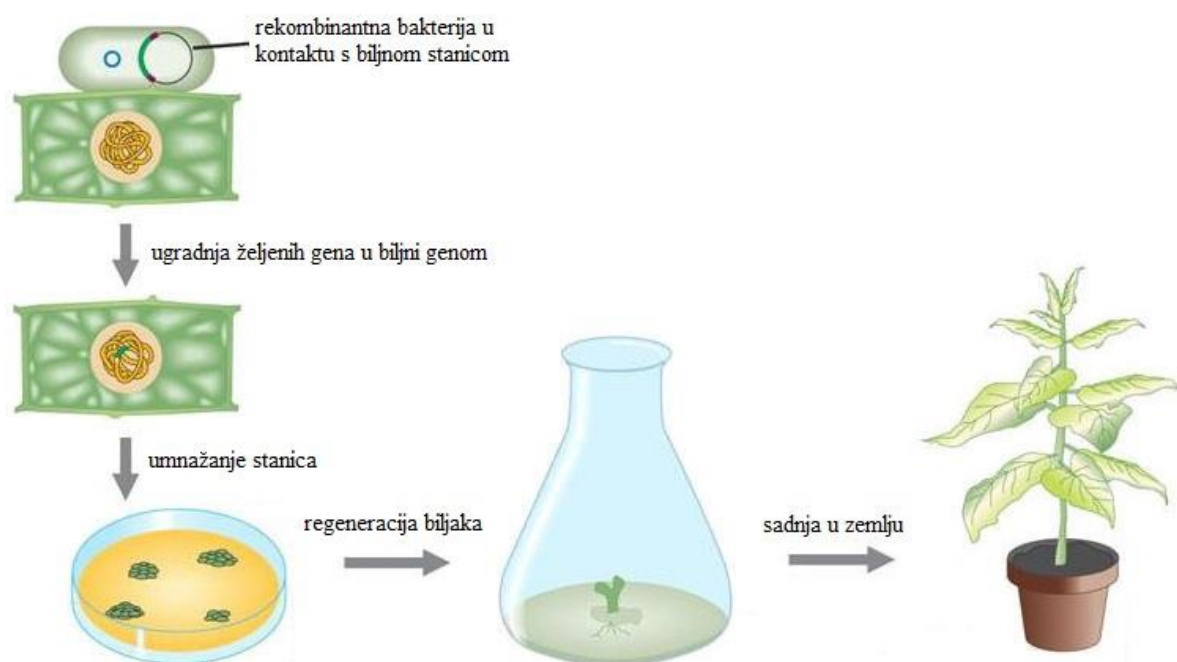
Kako bi dospio u bakterijsku stanicu potrebno je izolirati i bakterijski plazmidni vektor te ga pocijepati s istom restrikcijskom endonukleazom s kojom se pocijepao i gen kandidat (Slika 3.). Na taj način su obje molekule DNA, i bakterijska i gena kandidata, pocijepane na identičnom redoslijedu te se nastali jednolančani krajevi DNA sparuju vodikovim vezama jer su komplementarnih baza, a enzim DNA ligaza dovršava povezivanje uspostavom kovalentne fosfatno-esterske veze.



Slika 3. Primjer kidanja DNA pomoću restriksijske endonukleaze *EcoRI* i povezivanja dviju molekula DNA u jednu rekombinantnu molekulu (izvor: Cooper G.M., Hausman R.E., Lauc G., Zoldoš V. Stanica : molekularni pristup [Internet]. Medicinska naklada; 2010.)

Sparivanjem DNA gena kandidata i vektora nastaje rekombinantni klon koji nosi fragment molekule DNA koju želimo umnožiti u biljci. Tako dobivena rekombinantna molekula DNA prvo se ugrađuje natrag u bakterijsku stanicu (najčešće roda *Agrobacterium*), pomoću koje se

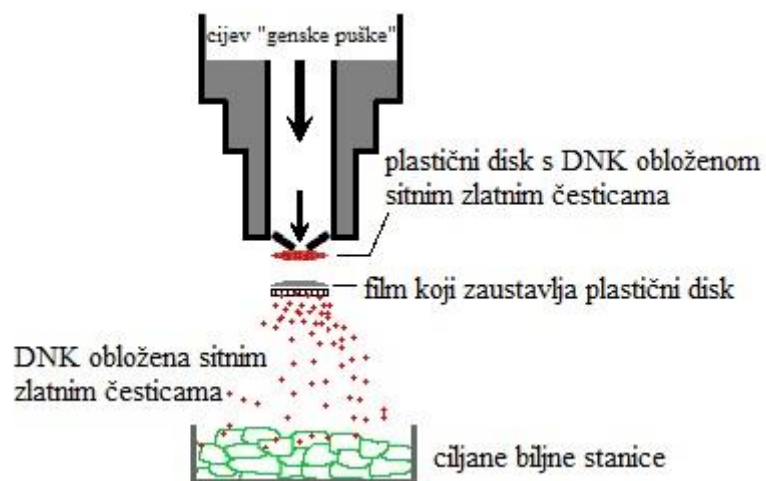
prenosi dalje u biljni genom inkubiranjem komadića biljnog tkiva u bakterijskoj suspenziji (Slika 4.). U neke se biljne stanice tako ugradila željena rekombinantna DNA. Slijedi selekcija modificiranih biljaka na selektivnim podlogama koje dopuštaju rast samo onim biljnim stanicama u kojima se nalazi željeni rekombinantni gen. Biljne se stanice zatim umnažaju, iz njih se regeneriraju transformirane biljke koje su spremne za uzgoj u zemlji.



Slika 4. Stvaranje transgenične biljke pomoću bakterije roda *Agrobacterium* (modificirano iz Griffiths i sur. (2008), 743-744.)

2. 2. 1. 2. Stvaranje transgeničnih biljaka unošenjem gena metodom „genske puške“

„Genska puška“ (engl. *gene gun*) je uređaj koji radi na način da pod visokim pritiskom „ispucava“ sitne čestice zlata ili volframa koje se nalaze na plastičnom disku (Slika 5.). Na sitnim česticama zlata ili volframa se nalaze prethodno reverzibilno vezane kopije željenog gena. Neke stanice se prilikom ispucavanja čestica unište, a u nekim željeni gen dospije u jezgru te se ugradi u genom. Transformirane biljke se regeneriraju i selekcioniraju pomoću selektivnih podloga kao u prethodnoj metodi te se potom sade u zemlju.



Slika 5. Shematski prikaz principa rada „genske puške“ (modificirano iz: M. Stahr, D. Stimpson: Genetic Seed Testing: Introduction & Current Topics, 2012)

2. 3. Primjena transgeničnih biljaka u farmaceutske svrhe

2. 3. 1. „Jestiva cjepiva“

Pojam „jestivo cjepivo“ se odnosi na transgeničnu biljku koja nosi antitijela protiv uzročnika određene bolesti i namijenjena je konzumaciji, bilo u sirovom obliku bilo blago toplinski obrađenu.

Jestiva cjepiva su, u teoriji, idealan način uporabe transgenične biljke budući ga ljudi mogu uzimati oralno, praktički bez potrebe za profesionalnim zdravstvenim djelatnicima i sterilnih igala. Također se može izbjeći komplicirani proces pročišćavanja i čuvanja cjepiva jer bi sami prehrambeni proizvod bio „cjepivo“. Biljke koje se koriste za takvo cjepivo mogu biti uzgojene lokalno i tako se smanjuju troškovi transporta na udaljeni dio svijeta, skladištenja na niskim temperaturama i nema potrebe za održavanjem sterilnih uvjeta. Nadalje, eliminira se potencijalni rizik od infekcije pacijenta kontaminiranim proizvodom jer u pravilu biljke nisu domaćini ljudskih patogena i u tom smislu cjepivo ne bi bilo rizično. Posebno je to korisno u zemljama trećeg svijeta gdje liječnička pomoć često nije dostupna, ne postoje organizirane službe za brigu o javnom zdravlju stanovništva, higijena je manjkava te je time visok rizik zaraze ili u drugim siromašnim zemljama, čije je stanovništvo često ugroženo političkim ili ratnim nemirima, a u novije vrijeme i klimatskim ekstremima, gdje su otežane ili čak nemoguće akcije cijepljenja. Svake godine cjepivo ne stigne do 20 % djece u zemljama u razvoju, zbog čega godišnje umire oko tri milijuna djece.⁷ Zdravstvene statistike pokazuju da je tih 20 % djece još uvijek lišeno cjepiva protiv šest bolesti: dječje paralize, difterije, hripavca, ospica, tetanusa i tuberkuloze.

Problem jestivih „cjepiva“ je uspostavljanje točne doze antitijela u takvoj hrani, ako je premala nema značaja u liječenju, a ako je prevelika ne znaju se točne nuspojave. Nadalje, uzmimo za primjer da se koristi modificirana banana. Sami plod banane dolazi u više veličina i pitanje je kako će korisnik, koji nema pristup medicinskom osoblju niti vagi znati koliko točno banana smije konzumirati. Također, potrebna su daljnja testiranja dok se ne dobije kontinuirana količina antitijela po određenog količini ploda – na količinu antitijela ne smiju u visokoj mjeri utjecati okolišni čimbenici.

Zadnjih 20 godina razvijaju se metode za sintezu antigena virusa hepatitisa B pomoću biljaka. Osim cjepiva protiv hepatitisa B, koje je razrađeno i potrebno ga je samo usavršiti, razvija se i oralni lijek (engl. *food-grade vaccine*, FGV). Oralni lijek (Slika 6.) nije u punom smislu

„jestivo cjepivo“, ali se sastoji od liofiziranog praha tkiva transgenične biljke (na primjer zelene salate) pa stoji negdje na pola puta između „jestivog cjepiva“ i klasičnog lijeka za oralnu primjenu. Prednost kapsula ili tableta koje sadrže tkivo biljke sa željenim antigenom u odnosu na „jestivo cjepivo“ je prvenstveno u točnoj dozi. Nadalje, antigeni iz biljke konzervirani na taj način imaju mnogo veći rok trajanja nego sama biljka.

Iako se oralni lijekovi nisu pokazali dovoljno dobri kao cjepivo koje se standardno koristi kao način imunizacije protiv hepatitisa B, mogu poslužiti umjesto docjepljivanja (Slika 6.). Preliminarna istraživanja potvrđuju učinkovitost kombinacije parenteralnog liječenja i oralnih lijekova dobivenih iz transgenične biljke.⁸



Slika 6. Mogućnosti u imunizaciji protiv virusa hepatitisa B pomoću parenteralnog i oralnog lijeka dobivenog pomoću transgenične biljke (modificirano iz Pniewski T. (2013) The Twenty-Year Story of a Plant-Based Vaccine Against Hepatitis B: Stagnation or Promising Prospects?)

2. 3. 2. Konvencionalna cjepiva

Biljni materijal temeljito se pročišćava određenim postupcima u kontroliranoj atmosferi kako bi se ekstrahirali željeni sastojci za imunizaciju u vidu klasičnog cjepiva ili lijekova (Slika 1.).

Umjesto transgenične biljke koja je normalno rasla u zemlji, mogu se koristiti i stanice biljaka u kulturi. Prednost je što stanice ne ovise o klimatološkim i ostalim ekološkim promjenama, primjerice kvaliteti zemlje, godišnjem dobu, duljini dana. Nema rizika od kontaminacije mikotoksinima, herbicidima ili pesticidima i nastaje mnogo manje nusprodukata (na primjer vlakna, ulja, voskovi, fenoli i sekundarni metaboliti koje biljka proizvodi). I to dovodi do jedne od najznačajnijih prednosti – mnogo je jednostavniji proces izolacije i pročišćavanja uzoraka. Također se treba uzeti u obzir kako polja sa usjevima transgeničnih biljaka koje se koriste za proizvodnju stranih proteina i antitijela, kao što su kukuruz ili riža, mogu putem peludi, koje prenosi vjetar, kontaminirati biljke koje su na normalnim poljima i namijenjene za prehranu. Sve to zahtjeva dodatnu brigu o biološkoj sigurnosti.⁹

2. 3. 3. Lokalna primjena

Sami biljni materijal, primjerice list ili kultura biljnih stanica ali i pročišćeni biljni ekstrakt mogu se direktno primijeniti na koži ili sluznici (Slika 1.). To se naziva lokalnom odnosno topikalnom primjenom. Za antitijela dobivena iz biljaka koji su specifična za proteine bakterije *Streptococcus mutans* i virusa *Herpes simplex* je poznato kako smanjuju vjerojatnost zaraze kada su primijenjena topikalno.¹⁰ U bliskoj budućnosti klinički će se testirati drugi kandidati za primjenu na sluznici, primjerice antitijelo protiv virusa humane imunodeficijencije za kojeg je predviđeno da se koristi kao vaginalni mikrobicid.¹⁰

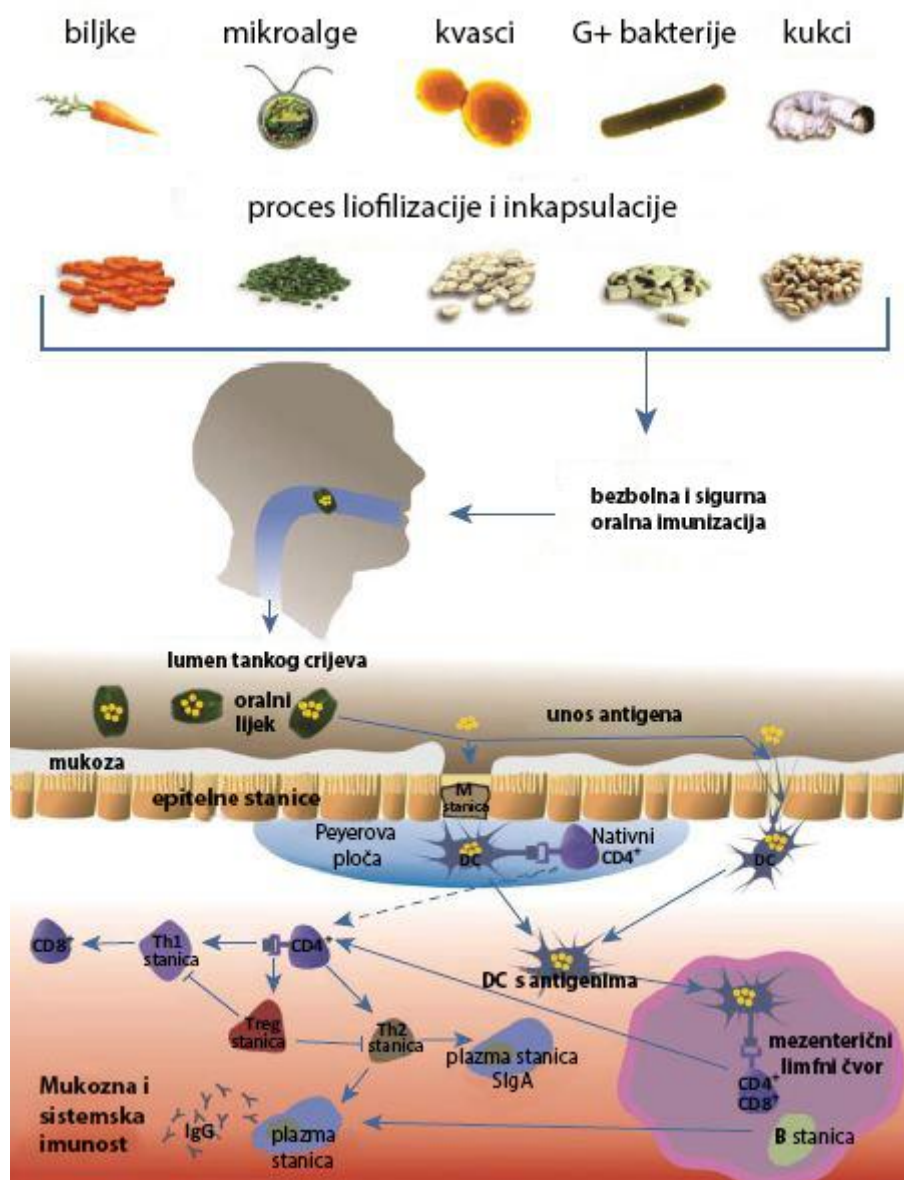
2. 4. Primjeri transgeničnih biljaka koje se koriste u terapijske svrhe

2.4.1. Primjena na ljudima

Prvi rekombinirani terapijski protein proizveden pomoću biljaka, točnije duhana i suncokreta, je humani hormon rasta.²

Mason i sur. (1992.) su kasnije razvili transgenični duhan koji sadrži antigen (HBsAg) hepatitisa B. Taj je antigen bio jako sličan onome dobivenom u humanom serumu i rekombiniranom kvascu.²

Oralna cjepiva dobivena pomoću transgeničnih biljaka mogu se koristiti jednako kao i ona dobivena pomoću mikroalgi (na primjer *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Schizochytrium spp.*, *Phaeodactylum tricornutum*), kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae*), Gram pozitivnih bakterija (roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*) i kukaca (dudov svilac, *Bombyx mori*). Mukozni i sistemski imuni odgovori inducirani su kao posljedica translociranja proteinskih antigena pomoću M ili dendritičkih (engl. *dendritic cell*, DC) predočnih stanica koje posreduju prezentaciju antigena u limfocite odnosno potiču aktivaciju B-limfocita specifičnih za te antigene (Slika 7.).



Slika 7. Shematski prikaz imunološkog odgovora u epitelu potaknutog uzimanjem proteinskih antigena iz oralnog lijeka (modificirano iz Rosales-Mendoza, S.; Angulo, C.; Meza, B. (2016). Food-Grade Organisms as Vaccine Biofactories and Oral Delivery Vehicles)

U svibnju 2012. je od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (engl. U. S. *Food and Drug Administration*, FDA) odobren prvi enzim proizveden pomoću biljaka, ELEYISO™ (taligluceraza alfa). Korištene su stanice mrkve kako bi se proizveo rekombinantni enzim taligluceraza alfa, koji se koristi u terapiji odraslih s Gaucherovom bolešću. Gaucherova bolest je rijedak nasljedni poremećaj, najčešća je među Aškenazi Židovima, a dovodi do povećanja jetre i slezene i smečkaste pigmentacije kože, može uzrokovati i pojavu žutih mrlja u očima.

Američka tvrtka Mapp Biopharmaceutical Inc. je u listovima duhana proizvela lijek koji se zove ZMapp, a korišten je 2014. u Africi protiv virusa ebole.² Sedam je pacijenata koji su dobili tretman tim lijekom do listopada 2014. u potpunosti oporavljeno. Međutim, jedan pacijent je tretman primio kasnije, u studenom 2014., podlegao je bolesti i umro. Zbog nedovoljne količine tog lijeka, ostali pacijenti nisu primili tretman. ZMapp je jedini lijek koji se pokazao učinkovit za liječenje oboljelih od ebole, iako ga Američka Agencija za hranu i lijekove nije odobrila.²

Potrebno je dosta vremena kako bi se razvio lijek koji koristi tehnologiju PMP-a, stoga ta tehnologija nažalost trenutno nije dovoljna da bi se borila s iznenadnim epidemijama kao što je ebola, teški akutni respiratorni sindrom (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS) ili bliskoistočni respiratorni sindrom (engl. *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*, MERS-CoV).

2. 4. 2. Životinjske zaraze

"Jestiva cjepiva" pokazala su se kao dobro sredstvo u borbi protiv zoonoza. Zoonoze su zarazne bolesti koje se prenose između ljudi i životinja. Zoonoze zato nisu isključivo problem u mesnoj industriji nego prijete i ljudima, uzrokujući više od 60 % slučajeva zaraze ljudi.¹¹ Otprilike 75 % alarmantnih zaraznih bolesti u ljudi potiče od patogena koji uzrokuju zoonoze.¹¹ Budući su antibiotici često korišteni za zaštitu stoke od bakterijskih bolesti razvijaju se razni sojevi bakterija rezistentni na antibiotike što predstavlja razlog za brigu, jer su u budućnosti moguće epidemije ako se ne nađe novi lijek protiv te, sada rezistentne, bakterije.

Korištenje oralnih cjepiva biljnog porijekla pokazalo je obećavajuće rezultate u suzbijanju različitih životinjskih bolesti. Primjer su svinje hranjene transgeničnim biljnim stanicama dobivenih iz duhana koje proizvode specifična antitijela protiv svinjskog reproduktivnog i respiratornog sindroma.¹²

2.5. Obećavajući kandidati za jestiva cjepiva

2. 5. 1. Ljubičaste rajčice protiv dijareje uzrokovane rotavirusom

Diego Orzaez, s instituta Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) u Španjolskoj, proizveo je imunoglobuline u jestivom organu biljke, točnije rajčici ljubičastog ploda.¹³ U plodu transgenične rajčice se nalazi visoka koncentracija hIgA_2A1 antitijela koje djeluje protiv rotavirusa. Količina tog antitijela je otprilike 4 % ukupnih proteina topljivih u vodi. Orzaez smatra kako da bi konzumacija takvih rajčica bila sigurna.¹⁴

2. 5. 2. Riža protiv alergije na grinje

Yang L. i sur. (2007.) imaju alternativan pristup konvencionalnom pristupu u imunoterapiji protiv alergija. Razvili su transgenično zrno riže koje sadrži glikoprotein Der p 1 i služi za imunizaciju protiv alergije na grinje.¹⁵ Njihovi rezultati pokazuju kako je takva riža jestiva, sigurna i potencijalno jestivo cjepivo protiv alergije na grinje.

2. 5. 3. Rajčice protiv malarije

Smrtnost od zaraze malarijom se povećava jer su se razvili sojevi roda *Plasmodium* otporni na lijekove. Bebe i mala djeca zaraženi malarijom često umiru od ozbiljne anemije i klonulosti od brojnih infekcija. Ukoliko se majka zarazila malarijom tijekom trudnoće, novorođenčad umire od komplikacija pri porodu ili niske porođajne težine. Za zaštitu od malarije potrebno je provesti protokol cijepljenja u intervalima kako bi zaštitio ljude prilikom svake faze zaraze. Cijepljenja se provode u intervalima od 4 do 6 tjedana, a u dozi su dva različita antigena.¹⁶ Gotovo je nemoguće cijepiti dvije milijardi ljudi na takav način. Chowdhury i Bagasra (2007.) s Claflin universityja su zamislili jestivo cjepivo koristeći različite transgenične rajčice. Različiti oblik, boja i veličina rajčice bi nosila drugo antitijelo i izgledom bi bile lako prepoznatljive, a ljudi bi se educirali koju rajčicu kada pojesti.

3. ZAKLJUČAK

Zadnjih dvadesetak godina ponovo se intenzivnije istražuju mogućnosti upotrebe biljaka u farmaceutске svrhe. Od davnina se biljke koriste kao lijek, iz njih se ekstrahiraju vrijedni prirodni sastojci ili se primjenjuju direktno na koži, a sada se pomoću novih saznanja i napretka u rekombinantnoj tehnologiji DNA biljke mogu genetski modificirati tako da proizvode željena antitijela ili proteine koji se koriste u imunizaciji.

Već su brojni primjeri primjene transgeničnih biljaka u liječenju, a najviše se ističe genetski modificirani duhan koji je proizveo antitijela protiv virusa ebole.

Novi korak u želji za liječenjem bolesti "trećeg svijeta" je proizvodnja takozvanog „jestivog cjepiva“. To su transgenične biljke koje u sebi sadrže antitijela protiv određenih bolesti, a konzumiraju se sirove ili djelomično termički obrađene. Prednost takvog lijeka je niska cijena, pristupačnost i mogućnost oboljelih da si sami uzmu takvo „cjepivo“ ukoliko im je medicinska skrb nedostupna. Testiranja na životinjama su pokazala pozitivne učinke, dok se za testiranje na ljudima i stavljanje na tržište još rade detaljna ispitivanja.

4. LITERATURA

1. Jelaska, S.; Mihaljević, S.; Bauer, N. (2005). Production of biopharmaceuticals, antibodies and edible vaccines in transgenic plants. *Current Studies of Biotechnology Volume 4*: 121-127.
2. Yao, J.; Weng, Y.; Dickey, A.; Wang, K. Y. (2015). Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 28549-28565.
3. Hair-Bejo, M. (2015). Farming of Plant-Based Veterinary Vaccines and Their Applications for Disease Prevention in Animals. *Advances in Virology volume 2015*: **12**: 1-12.
4. Arakawa T., Chong D. K. X., Merritt J. L., Langridge W. H. R. (1997). Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Trans Res* **6**:403-413.
5. McGarvey P. B., Hammond J., Dienelt M. M., Hooper D. C., Fu Z. F., Dietzschold B., Kiprowski H., Michaels F. H. (1995). Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Bio/Technology*, **13**:1484-1487.
6. Ehsani P., Khabiri A., Domansky N. N. (1997). Polypeptides of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **190**:107-111.
7. WHO, GlobalData Pharma Intelligence Center (2017)
8. Pniewski T. (2013) The Twenty-Year Story of a Plant-Based Vaccine Against Hepatitis B: Stagnation or Promising Prospects? *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1978-1998.

9. Sparrow P., Broer I., Hood E.E., Eversole K., Hartung F., Schiemann J. (2013) Risk assessment and regulation of molecular farming—A comparison between Europe and US. *Curr. Pharm. Des.*; **19**: 5513–5530.

10. Peters J., Stoger E. (2011). Transgenic crops for the production of recombinant vaccines and anti-microbial antibodies, *Human Vaccines*, 7: **3**, 367-374.

11. Shalid N., Daniell H. (2016). Plant-based oral vaccines against zoonotic and non-zoonotic diseases. *Plant Biotechnol J.* 2016 Nov; 14(**11**): 2079–2099.

12. Chia M.-Y., Hsiao S.-H., Chan H.-T., Do Y.-Y., Huang P.-L., Chang H.-W., Tsai Y.-C. *i sur.* (2010) Immunogenicity of recombinant GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed in tobacco plant. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **135**: 234–242.

13. Juárez, P.; Presa, S.; Espí, J. *i sur.* (2012). Neutralizing antibodies against rotavirus produced in transgenically labelled purple tomatoes. *Plant Biotechnol. J.* **10**, 341–352.

14. Lössl, A.G.; Clarke, J. L. (2013). Molecular pharming: manufacturing medicines in plants. *Immunotherapy* Vol. 5, No. **1**: 9-12.

15. Yang, L.; Kajiura, H.; Suzuki, K.; Hirose, S.; Fujiyama, K.; Takaiwa, F. (2007). Generation of transgenic rice seed-based edible vaccine against house dust mite allergy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **365**: 334-339.

16. Chowdhury, K.; Bagasra, O. (2007). An edible vaccine for malaria using transgenic tomatoes of varying sizes, shapes and colors to carry different antigens. *Medical Hypotheses* **68**: 22-30.

17. Daniell, H.; Singh, D. N.; Mason, H.; Streatfield, J. S. (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trend Plant Sci* **14**: 669-679.

18. Spök A., Karner S. (2008). *Plant Molecular Farming, Opportunities and Challenges*. Office for Official Publications of the European Communities; Kopstal, Luxembourg: JRC Technical Report EUR 23383 EN

19. Zeitlin L, Olmsted S, Moench T, Co M, Martinell B, Paradkar V, et al. (1998). A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat Biotechnol* **16**:1361-1364.

20. Mor, T. S.; Gomez-Lim, M. A.; Palmer, K. E. (1998). Perspective: edible vaccines – a concept coming of age. *Trends in Microbiology* Vol. 6, No. **11**: 449-455.

21. Stahr M., Stimpson D. (2012). *Genetic Seed Testing: Introduction & Current Topics*. On-Line URL: <https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=https://visionpdf.com/download/genetic-seed-testing.html?reader%3D1>, AOSA/SCST Webinar November 14, 2012. datum pristupa 5. 6. 2017.

22. Kong Q., Richter L., Yang Y.F., Arntzen C.J., Mason H.S., Thanavala Y. (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**: 11539–11544

23. Thanavala Y., Mahoney M., Pal S., Scott A., Richter L., Natarajan N., Goodwin P., Arntzen C.J., Mason H.S. (2005). Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**: 3378–3382.

24. Cooper G.M., Hausman R.E., Lauc G., Zoldoš V. Stanica : molekularni pristup [Internet]. Medicinska naklada; 2010.

25. Griffiths A. J. F., Wessler S., Lewontin R., Carrol S. (2008). Genetic engineering. Intoduction to Genetic Analysis, 9. izdanje, 742-745. New York, USA: W. H. Freeman and Company.

26. URL: https://www.mun.ca/biology/scarr/Transgenic_Plants.html , datum pristupa 12.09.2018.

27. Walmsley, A. M.; Arntzen, Ch. J. (2000). Plants for delivery of edible vaccines. Current Opinion in Biotechnology, **11**:126–129.

28. Miller-Kittrell M. (2014). Chapter 8: Recombinant DNA Technology. North Carolina State University, URL: <http://learning.hccs.edu/faculty/milind.suraokar/biol2420/lecture-8> datum pristupa 12.09.2018.

29. Rosales-Mendoza,S.; Angulo, C.;Meza, B. (2016). Food-Grade Organisms as Vaccine Biofactories and Oral Delivery Vehicles. Trends Biotechnol. **34(2)**:124-136.